

Aus der Universitäts Kinder- und Jugendklinik Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. M. Radke

und

aus der Urologischen Klinik und Poliklinik Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. O. Hakenberg

**Mineralisierungs-Inhibitoren in Serum und Urin
Nephro-/Urolithiasis: eine prospektive Fall-Kontroll-Studie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae
(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Fabian Ludwig
geboren am 25.08.1985 in Frankfurt Oder

Rostock, im März 2016

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. O. Hakenberg
Urologische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. D. Haffner
Klinik für Pädiatrische Nieren-, Leber- und
Stoffwechselerkrankungen, MH Hannover

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Dr. med. habil. W. L. Strohmaier
Klinik für Urologie und Kinderurologie, Klinikum Coburg

Datum der Einreichung: 22.03.2016

Datum der Verteidigung: 25.01.2017

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Verzeichnis der Abkürzungen	III
III	Verzeichnis der Abbildungen	IV
IV	Verzeichnis der Tabellen	V
1	Einleitung	1
1.1	Klinik der Urolithiasis	1
1.2	Diagnostisches und therapeutisches Management bei Nephrolithiasis	1
1.3	Chemische Zusammensetzung der Nieren- und Harnsteine	2
1.4	Ätiologie und Pathogenese der Urolithiasis	2
1.5	Regulation des Mineralstoffwechsels	5
1.5.1	Eigenschaften und Funktionen des Fibroblast growth factors-23	5
1.5.2	Eigenschaften und Funktionen von Fetuin-A	7
2	Ziel der Arbeit	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Design der Studie	10
3.2	Patienten und Kontrollen	10
3.2.1	Ein- und Ausschlusskriterien	10
3.2.2	Ablauf der Studie	10
3.3	Material	11
3.4	Methoden	12
3.4.1	Untersuchungsablauf	12
3.4.2	Steinanalyse	12
3.4.3	Qualitativer Nachweis von Fetuin-A durch Elektrophorese und Westernblot	12
3.4.4	Berechnung abgeleiteter Parameter	13
3.4.5	Statistische Verfahren	13
4	Ergebnisse	14
4.1	Charakteristika der Probanden	14
4.2	Ergebnisse der Steinanalyse	15
4.3	Ergebnisse der Serumanalysen	15
4.4	Ergebnisse der Urinalysen	18
5	Diskussion	21

6	Zusammenfassung	24
7	Thesen	25
8	Literaturverzeichnis	26
9	Eidesstattliche Erklärung	31

II Verzeichnis der Abkürzungen

AHSG	α_2 -Heremans Schmidt Glykoprotein
CPP	Calcioprotein Partikel
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate
ESWL	Extracorporeal shock wave lithotripsy
FGF-23	Fibroblast growth factor-23
HRGP	Histidine-rich Glykoprotein
KNG	Kininogen
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
NPT	Natriumabhängigen Phosphat Cotransporter
PNL	Perkutane Nephrolithotomie
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenfluori
RT	Raumtemperatur
TmP/GFR	Tubuläre maximale Phosphatrückresorption/Glomeruläre Filtrationsrate
URS	Ureterorenoskopie
25OHD	25-Hydroxycholecalciferol
1,25DHCC	1,25-Dihydroxycholecalciferol

III **Verzeichnis der Abbildungen**

Abb. 1:	Zusammenspiel von homogenen Nukleation, „cristal cell interaction“ und heterogenen Nukleation.	4
Abb. 2:	Pathogenese der Randall-Plaques.	4
Abb. 3:	Die Regulation und Funktion von FGF-23.	7
Abb. 4:	Struktur von Fetuin-A.	8
Abb. 5:	Qualitativer Nachweis von Fetuin-A in Serum und Urin.	17
Abb. 6:	Fetuin-A und FGF-23 im Serum von Patienten und Kontrollen.	17
Abb. 7:	Zusammenhang zwischen Phosphatschwelle und Phosphatserumkonzentration bei Patienten und Kontrollen.	19
Abb. 8:	Die auf Kreatinin normierten Konzentrationen von Fetuin-A bei Patienten und Kontrollen.	19
Abb. 9:	Die Fetuin-A- und Citratkonzentration vor und nach Steinabgang.	20

IV Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Löslichkeitsprodukte verschiedener im Urin vorkommender Salze.	3
Tab. 2:	Charakteristika der Studienteilnehmer.	14
Tab. 3:	Steinlokalisation, therapeutisches Verfahren und Steinfreiheit.	15
Tab. 4:	Biochemische Daten von Patienten und Kontrollen.	16
Tab. 5:	Die im 12-Stunden-Sammelurin bestimmten und auf Kreatinin normierten Konzentrationen.	18

1 Einleitung

Die Ablagerung von Konkrementen im Harntrakt (Urolithiasis) betrifft zu 97% das Nierenbeckenkelchsystem (Nephrolithiasis) und/oder den Ureter (Ureterolithiasis).

Da diese Erkrankung in Deutschland mittlerweile den Charakter einer Volkskrankheit annimmt, rückt sie zunehmend in den Mittelpunkt des medizinischen Interesse (Bauer-Delto 2011). Die Rate der Neuerkrankung hat sich von rund 0,5% im Jahre 1979 auf knapp 1,5% im Jahre 2000 etwa verdreifacht und in Deutschland liegt die derzeitige Prävalenz bei ca. 5%. In den USA ist die Prävalenz bei Männern und Frauen noch höher, was unter anderem mit Kochsalz- und Eiweißreicher Ernährung und Bewegungsmangel in Verbindung gebracht wird (Coe et al. 2005; Schlieper et al. 2007). Eine weitere Ursache für die zunehmende Inzidenz der Urolithiasis ist der häufige Einsatz von Antibiotika. Dieser führt über die generelle Beeinträchtigung der Darmflora zu einer reduzierten Besiedlung mit dem Oxalat-abbauendem Bakterium *Oxalobacter formigenes* und einem konsekutiv erhöhten Risiko für die Bildung von Calciumoxalatsteinen (Gnanandarajah et al. 2012).

1.1 Klinik der Urolithiasis

Konkremente, die den Ureter obstruieren, verursachen eine typische Nierenkolik. Diese beginnt meist plötzlich und kann mehrere Stunden andauern. Die Schmerzen sind krampfartig, treten anfallsweise auf und gehen mit Übelkeit und Erbrechen einher. Steine im uretero-pelvinen Übergang projizieren Schmerzen in die Flanke, während bei Konkrementen im Ureter die Schmerzen in den Mittel- oder Unterbauch ausstrahlen und prävesikale Steine Schmerzen vor allem im Genitalbereich verursachen. Während der Steinpassage durch den Harntrakt treten die Schmerzen in diesen Headschen Zonen nacheinander auf (Coe et al. 2005).

1.2 Diagnostisches und therapeutisches Management bei Nephrolithiasis

Zur Sicherung der Diagnose und Identifizierung der Ursache dienen vor allem Anamnese, klinische Untersuchung und Laborwerte. Die Lokalisation der Steine erfordert den Einsatz bildgebender Verfahren (Sonographie, Röntgen und Computertomographie). Die chemische Analyse der Steine ist Voraussetzung zur Klärung der Ätiologie und trägt ggf. auch zur Prävention eines Rezidives bei. Hierzu werden im Sammelurin die Konzentrationen lithogener (Calcium, Oxalat und

Zystin) und inhibitorischer (Citrat und Magnesium) Substanzen bestimmt (Bauer-Delto 2011).

Nierensteine mit einem Durchmesser von weniger als 5 mm passieren die Harnwege in 80% der Fälle, während Konkreme mit einer Größe von 5-7 mm nur zu 50% spontan abgehen. Eine Indikation zur urologischen Intervention besteht bei Steinen mit einem Durchmesser von mehr als 7 mm (Coe et al. 2005). Die gezielte Zerstörung mit Druckwellen (Extracorporeal shock wave lithotripsy, ESWL) ist als minimal invasive Intervention bei vielen Patienten die Therapie der Wahl. Bei diesem Verfahren werden die Steine mit Hilfe von Sonographie oder Röntgen lokalisiert und anschließend mit elektromagnetischen Druckwellen (2-4/Sekunde) soweit zerkleinert, dass die Fragmente die Harnwege ungehindert passieren können. Sofern eine ESWL kontraindiziert ist (z.B. bei Gerinnungsstörungen, Schwangerschaft und Aortenaneurysma) müssen invasivere Maßnahmen wie die Ureterorenoskopie (URS) oder die perkutane Nephrolithotomie (PNL) angewendet werden.

1.3 Chemische Zusammensetzung der Nieren- und Harnsteine

Calciumoxalat (Whewellit- und Weddellit) ist in 70% - 80% aller Fälle Hauptbestandteil der Harnsteine, während Struvit (Magnesium-Ammonium-Phosphat) und Harnsäure nur bei einem deutlich geringeren Teil der Patienten als Hauptbestandteil der Konkreme identifiziert werden (Hesse 2002; Coe et al. 2005). Bei den meisten Patienten entstehen Calciumoxalatsteine idiopathisch und ohne Nachweis einer weiteren Ursache wie es z. B. Hyperparathyreoidismus, Malabsorptionssyndrom oder tubuläre Azidose sein könnten (Coe et al. 1992).

1.4 Ätiologie und Pathogenese der Urolithiasis

Die Bildung von Nieren- und/oder Harnsteinen kann unter physikalisch-chemischen Gesichtspunkt betrachtet werden. Hierbei ist der Urin als wässrige Lösung verschiedener Salze anzusehen. Diese Salze fallen bei Überschreiten des individuellen Löslichkeitsproduktes aus. Im Wesentlichen sind im Urin neben Harnsäure die Kationen Calcium, Magnesium und Ammonium sowie die Anionen Chlorid, Citrat, Oxalat und Phosphat enthalten. Diese Ionen können zu verschiedenen Salzen zusammentreten (Magnesiumoxalat, Calciumoxalat, Calciumcitrat, Calciumphosphat, etc.), deren Löslichkeitsprodukte sich deutlich unterscheiden. So ist z. B. Magnesiumoxalat leichter löslich als Calciumoxalat und

Citrat vermag als Chelator sowohl Calcium- als auch Magnesiumionen zu komplexieren (Tab. 1).

Tab. 1: Löslichkeitsprodukte verschiedener im Urin vorkommender Salze (www.anorganik.chemie.vias.org).

Verbindung	Löslichkeitsprodukt
Magnesiumoxalat, MgC_2O_4	$8,57 \times 10^{-5} \text{ mol}^2/\text{l}^2$ (18°C)
Calciumoxalat, CaC_2O_4	$2,32 \times 10^{-9} \text{ mol}^2/\text{l}^2$ (25°C)
Calciumcitrat, Ca_3Cit_2	$1,56 \times 10^{-12} \text{ mol}^5/\text{l}^5$ (18°C)
Calciumphosphatapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$ (OH, Cl, F)	$2,07 \times 10^{-33} \text{ mol}^5/\text{l}^5$ (25°C)

Da im Urin ein Gemisch verschiedener Ionen vorliegt, sind die Löslichkeitsprodukte der zugehörigen Salze nicht mehr voneinander unabhängig. Bereits kleine Konzentrationsänderungen einzelner Kationen und/oder Anionen sowie Änderungen des pH-Wertes können zur Bildung von Kristallisationskeimen und damit zur Entstehung von Konkrementen führen oder auch die Bildung von Kristallisationskeimen verhindern.

Als Ausgangspunkt jeglicher Steinbildung wird die Entstehung sogenannter „Randall-Plaques“ vermutet. Die Beobachtungen und Überlegungen von Alexander Randall führten in den 1940er Jahren zu der Vermutung, dass die Bildung von Nierensteinen analog zur Bildung anorganischer Mineralien von Kristallisationskeimen ausgeht. Randall hatte bei rund 20% der von ihm obduzierten Leichen Calciumphosphatablagerungen im Interstitium der Papillenspitze (Randall-Plaques) beobachtet (Randall 1937; Evan et al. 2003) (Abb. 1).

Die homogene Nukleation als Ursache einer Nephrolithiasis wird erst bei extremer Übersättigung des Urins mit lithogenen Substanzen relevant und spielt möglicherweise bei der primären Hyperoxalurie eine Rolle. Für die Entstehung idiopathischer Kalziumoxalatsteine kann sie vernachlässigt werden. Als Ausgangspunkt jeglicher Steinbildung können sich Randall-Plaques (Calciumphosphatablagerungen) an der Papillenspitze bilden. Durch Erosionen ragen diese ins Tubuluslumen und begünstigen dort die Anlagerung und Bildung von Calciumoxalatsteinen (heterogene Nukleation) (Evan et al. 2003; Evan et al. 2005; Evan et al. 2007, Strohmaier et al. 2013). Andere Arbeitsgruppen konnten später zeigen, dass mit der Größe der Randall-Plaques auch das Risiko der Entwicklung von Nierensteinen zunimmt (Kim et al. 2005; Matlaga et al. 2007) (Abb. 2).

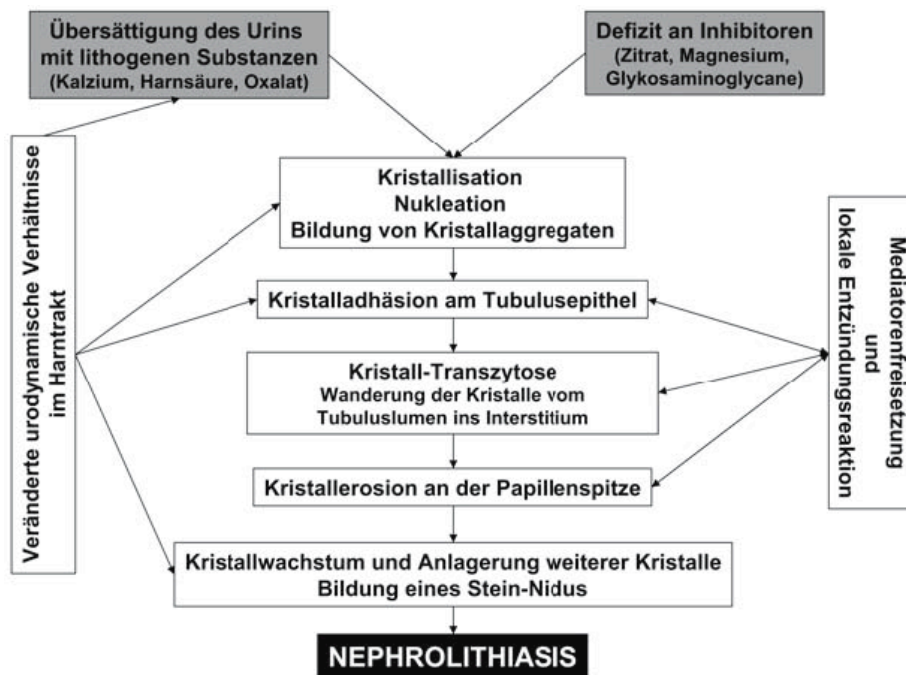


Abb. 1: Zusammenspiel von homogenen Nukleation, „cristal cell interaction“ und heterogenen Nukleation (Hautmann und Huland 2006).

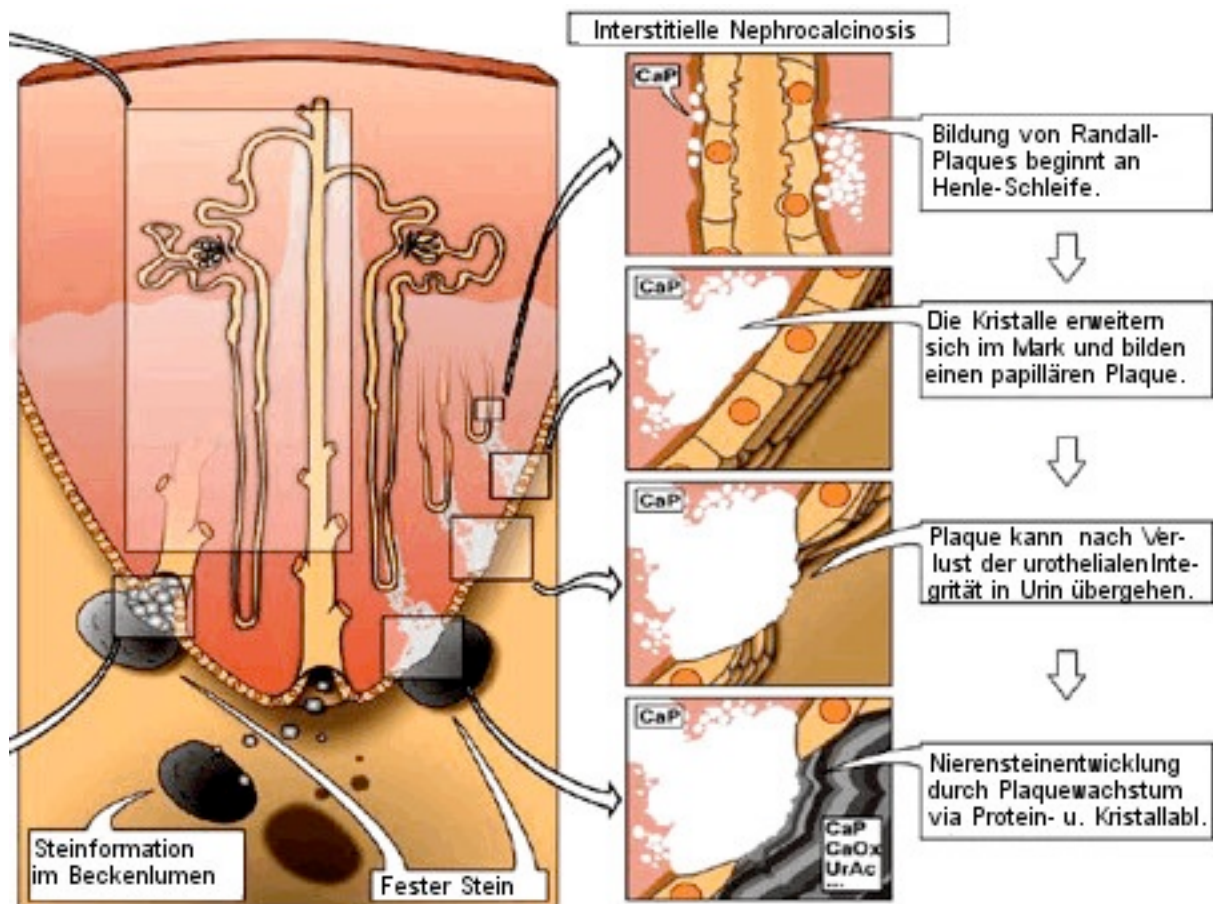


Abb. 2: Pathogenese der Randall-Plaques (modifiziert nach Vervaet et al. 2009).

Für die Entstehung der Randall-Plaques ist unter anderem eine hohe tubuläre Calciumkonzentration verantwortlich, die dann in Gegenwart geeigneter Anionen zur Kristallisation von Salzen führt. Diese primär gebildeten Salzkristalle haften zunächst am Tubulusepithel an und gelangen durch Transzytose in das Interstitium („crystal cell interaction“) (Kuo et al. 2003). Interessanterweise scheinen die Urinkonzentrationen von Citrat, Oxalat oder Phosphat keinen oder einen sehr geringen Einfluss auf die Plaquebildung zu haben (Kuo et al. 2003).

Neben dem Modell der tubulären Transzytose könnte auch die enge Beziehung zwischen dem Gefäßsystem und den Strukturen des Nephrons zur Bildung von Randall Plaques beitragen. Diese Hypothese beruht auf der häufig beobachteten Koinzidenz von Nierensteinen und „klassischen“ kardiovasulären Risikofaktoren (Hypertonie, Adipositas, Dyslipidämie und Diabetes mellitus Typ II) (Ramey et al. 2004; Siener et al. 2004). Eine gestörte Mikrozirkulation im Bereich der Vasa recta im inneren Nierenmark könnte den Abtransport interstitieller Calciumsalze behindern. Möglicherweise spielen auch atherosklerotische Veränderungen an der Nierenpapille eine wichtige Rolle. Solche oberflächlichen Veränderungen gehen mit hypoxischen Gewebsschäden und Zelluntergang sowie Detritusbildung einher. Der Zelldetritus wirkt als Fremdoberfläche und Kristallisationskeim und könnte die Steinbildung beschleunigen (Zhang et al. 2002, Stoller et al. 2004). Diese Hypothese wird durch Untersuchungen an isolierten Tubuluszellen gestützt (Cao 2006). Daher scheint, zum Ausschluss dieses Einflussfaktors auf die Steinbildung, eine Untersuchung von Steinpatienten ohne kardiovaskulären Risikofaktoren sinnvoll.

Die bisher dargestellten Mechanismen können die Bildung von Nierensteinen nur teilweise erklären, weisen aber prinzipielle Parallelen zur ektopen Mineralisierung auf. Es ist daher nahe liegend, dass auch andere, für die Gefäßverkalkung wesentliche Prozesse beteiligt sind.

1.5 Regulation des Mineralstoffwechsel

Für die Regulation des Mineralstoffwechsels spielen sowohl zelluläre als auch molekulare Faktoren eine Rolle. Neben den Osteoklasten und Osteoblasten als Matrixabbauende- und aufbauende Zellen sind auch Calcium, Phosphat, Calcitrol, Parathormon und der Fibroblast growth factor-23 an diesem Stoffwechsel beteiligt. Auch das von Hepatozyten synthetisierte multifunktionelle Protein Fetuin-A ist für Mineralisierungsprozesse von besonderer Wichtigkeit.

1.5.1 Eigenschaften und Funktionen des Fibroblast growth factors-23

Der Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) gehört zur Familie der Fibroblast growth factors und wirkt ähnlich wie FGF-19 und FGF-21. Das nicht glykolysierte Protein besteht aus 228 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa. Das Gen ist auf Chromosomen 12 lokalisiert und besteht aus 3 Exons (Wolf 2012).

FGF-23 wird hauptsächlich von Osteoblasten, aber auch von venterolateralen Thalamuskernen, Thymus und Lymphknoten synthetisiert. Die Freisetzung von FGF-23 wird vor allem durch hohe Phosphat- und/oder Calcitriolkonzentrationen im Serum getriggert. Darüberhinaus ist eine Regulation der FGF-23 Sekretion durch Parathormon wahrscheinlich (Yoshiko et al. 2007; Berndt et al. 2007; Emmett 2008).

FGF-23 wirkt über einen heterodimeren Rezeptor, der aus einem der vier FGF-Rezeptoren und dem Transmembranprotein Klotho besteht (Kuro-O 2012).

Die primäre physiologische Funktion von FGF-23 ist die Kontrolle der Phosphathomöostase durch Regulation der renalen Phosphatausscheidung. Sowohl die Typ IIa und Typ IIc Natriumabhängigen Phosphat Cotransporter (NPT) in den proximalen Tubuli als auch die Reduktion der Calcitriolsynthese über die Hemmung der renalen 1-alpha-Hydroxylase werden durch FGF-23 reguliert (Shimada et al. 2004, Wolf 2012).

Bei gesunden Individuen wird die Konzentration des Serumphosphats in sehr engen Grenzen konstant gehalten und das beinahe unabhängig von der täglichen Phosphatzufuhr. Hohe FGF-23 Serumkonzentrationen sind zumindest im Tiermodell eine Antwort auf eine erhöhte Phosphatzufuhr und induzieren eine erhöhte renale Phosphatausscheidung, eine transiente Inhibition der Calcitriolssynthese und damit eine Reduktion der Phosphatabsorption im Darm. Bei geringer Phosphataufnahme fällt die Serumkonzentration von FGF-23, die renale Phosphatreabsorption in der Niere nimmt zu und die Effizienz der Phosphatabsorption im Darm wird verbessert (Wolf 2012). Durch diese Feedback-Scheife auf Ebene der "Knochen-Nebenschilddrüse-Nieren Achse" werden die Calcium- und Phosphatkonzentration im engen Grenzen konstant gehalten, was von großer physiologischer Bedeutung ist (Abb. 3).

In einer Studie konnte bei einigen Patienten mit Urolithiasis eine reduzierte Phosphatschwelle, erhöhte Phosphatexkretion und eine Hypophosphatämie bei gleichzeitig erhöhter Konzentrationen von FGF-23 beobachtet werden (Rendina et al. 2006).

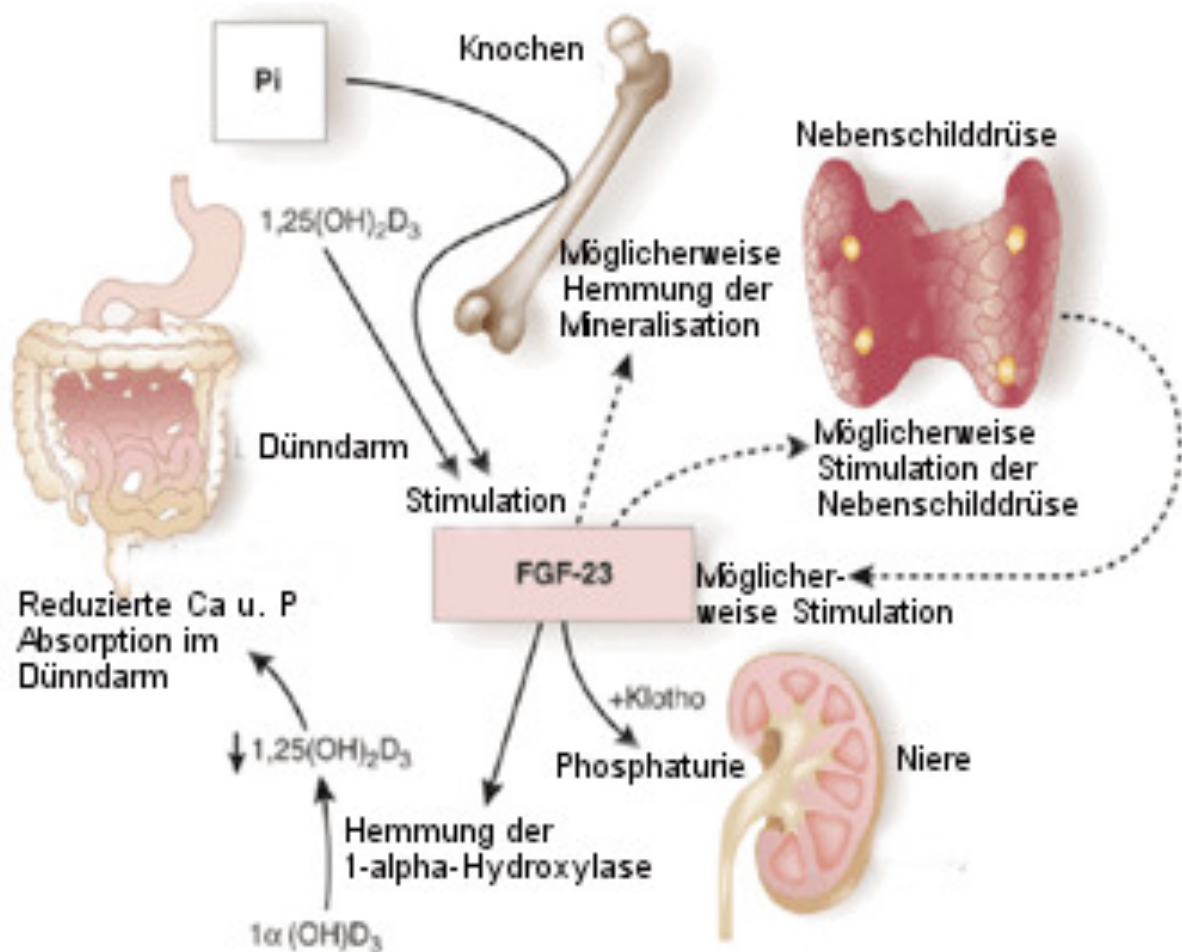


Abb. 3: Die Regulation und Funktion von FGF-23 (Emmett 2008).

1.5.2 Eigenschaften und Funktionen von Fetuin-A

Das Protein Fetuin-A, auch als α_2 -Heremans Schmidt Glykoprotein (AHSG) bezeichnet, spielt als Trägerprotein für Calciumionen und Verkalkungsinhibitor im Mineralstoffwechsel eine besondere Rolle.

Fetuin-A wird von einem Gen auf Chromosom 3 kodiert. Diese Gen (3q27 – 29) besteht aus 7 Exonen und 6 Introns, umfasst 8,2 kb, und codiert ein Protein mit 350 Aminosäuren (Osawa et al. 1997). Fetuin-A verfügt über 2–3 N-glykosidisch und 2-3 O-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydratketten und hat ein Molekulargewicht von ca. 59 kDa (Brylka et al.; Jahnen-Dechent 2002). Mit seinen 3 Faltungsdonänen (D1 – D3) ist es ein sehr kompaktes Protein, dass ebenso wie Kininogen und das "Histidine-rich Glykoprotein" (HRGP) zur Cystatin Superfamilie gehört (Dickson et al. 1983; Brown et al. 1997; Jahnen-Dechent 2002, 2008, Lee et al. 2009) (Abb. 4).

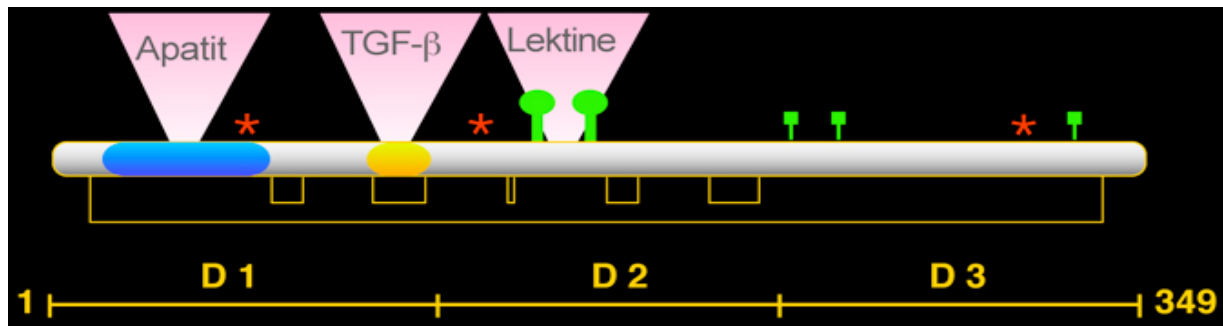


Abb. 4: Struktur von Fetuin-A (www.biointerface.rwth-aachen.de).

Die Serin-Phosphorylierungsstellen sind mit einem roten Stern gekennzeichnet. Die Disulfidbrücken, die für die Cystatin-ähnlichen Domänen D1 und D2 typisch sind, werden durch gelbe Verbindungslinien dargestellt.

Fetuin-A ist ähnlich wie Albumin ein Trägerprotein für Calciumionen und zusätzlich in der Lage, durch Komplexierung präformierter Calciumphosphat-Nanokristalle deren Aggregation zu verhindern (Jahnen-Dechent et al. 2008; Heiss et al. 2010; Pasch et al. 2012). Im Serum verhindern Fetuin-A und Albumin annähernd zu gleichen Teilen die Präzipitation von Calciumphosphaten. Angesichts der unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Proteine (Albumin: ca. 35 – 48 g/l; Fetuin-A: 0,3 - 0,8 g/l) weist alleine dieser Umstand auf das erhebliche Potential von Fetuin-A als Verkalkungsinhibitor hin (Jahnen-Dechent 2002; Heiss et al. 2010).

Gleichzeitig ist Fetuin-A für die Knochenmineralisierung von Bedeutung, da es Calciumapatit zu den Orten der orthotopen Mineralisierung transportiert und die Aktivität der am Knochenstoffwechsel beteiligten Cytokine moduliert (Szweras et al. 2002; Jahnen-Dechent 2002, 2008).

Aufgrund der bedeutenden Funktionen im Mineralstoffwechsel könnte ein dauerhafter Fetuin-A Mangel mit unterschiedlichsten Pathologien assoziiert sein. Die Forschung hat deshalb verschiedene Wege beschritten, um die Hypothese, dass Fetuin-A Mangel zu ektooper Mineralisierung und insbesondere zu Gefäßverkalkungen führen könne, zu prüfen.

Allerdings weist die Fetuin-A Knockout-Maus (AHSG^{-/-} Maus) eine nahezu normale Knochenmineralisierung auf und nur bei älteren Tieren wurden in geringerem Umfang Weichteilverkalkungen beobachtet. Erst nach Rückkreuzung dieser Mäuse auf einen verkalkungssensitiven DBA/2 Hintergrund und unter salzreicher, sowie zusätzlich mit Vitamin D und Phosphat angereicherter Ernährung entwickelten sich ausgedehnte systemische Verkalkungen (Jahnen-Dechent et al. 1997; Schäfer et al. 2003). Wahrscheinlich ist also ein alleiniger Fetuin-A Mangel nicht ausreichend, um die ektope Mineralisierung zu erklären.

2 Ziel der Arbeit

In dieser Pilotuntersuchung sollte geprüft werden, ob sich Anhaltspunkte finden lassen, dass FGF-23 und/oder Fetuin-A bei Nephrolithiasis eine pathophysiologische Bedeutung haben.

Obwohl 80% der Calciumoxalatsteine idiopathisch entstehen, ist das Wissen über die Ätiologie und Pathogenese der Urolithiasis unvollständig,

Die Modelle der homo- und heterogenen Nukleation sind nicht ausreichend, um die Pathogenese zu erklären und die für die orthotope und ektope Mineralisierung relevanten Regelkreise wurden in Hinblick auf die Entstehung von Nierensteinen bisher nur teilweise untersucht.

Unter den für die orthotope und ektope Mineralisierung relevanten Faktoren sind FGF-23 und Fetuin-A von großem Interesse. FGF-23 reguliert im Zusammenspiel mit Parathormon und Calcitriol die Homöostase von Calcium und Phosphat. Fetuin-A ist in der Lage, sowohl Calciumionen als auch bereits gebildete Calciumphosphatnanokristalle zu binden und die Aggregation zu verhindern.

Die Entstehung von Nierensteinen kann als Spezialfall der ektopen Mineralisierung aufgefasst werden. In einer Querschnittsstudie an Patienten mit Nierensteinen und gesunden Kontrollen sollte untersucht werden:

- ob sich die systemischen Konzentrationen von FGF-23 und Fetuin-A zwischen Patienten und Kontrollen unterscheiden.
- ob sich die maximale tubuläre Phosphatresorption (Phosphatschwelle) beider Gruppen unterscheidet.
- ob es nach Steinabgang zu einer Normalisierung der Fetuin-A- und Citratkonzentrationen im Urin kommt.

3 Material und Methoden

3.1 Design der Studie

Die prospektive Fall-Kontroll-Studie „Mineralisierungs-Inhibitoren im Serum und Urin bei Patienten mit Nephro-/Urolithiasis“ wurde von der Ethikkommission der Universität Rostock unter dem Geschäftszeichen A 2009/25 genehmigt.

Diese Studie zielte auf eine vergleichende Bestimmung von Mediatoren des Mineralstoffwechsels bei Patienten mit Nephro-/Urolithiasis und unbelasteten Kontrollpersonen.

3.2 Patienten und Kontrollen

Patienten und Kontrollen wurden in der Urologischen Universitätsklinik Rostock während eines stationären Aufenthaltes rekrutiert.

3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- Nieren- oder Harnleiterstein (Patienten)
- keine anderen den Mineralstoffwechsel betreffenden Erkrankungen (Patienten und Kontrollen)
- Alter über 18 Jahre

Ausschlusskriterien:

- Akute entzündliche Erkrankungen (z.B. Pneumonie, Osteomyelitis)
- Chronisch-entzündliche Erkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis)
- Hepatitis, HIV oder andere chronisch-infektiöse Erkrankungen
- Leberinsuffizienz
- Schwangerschaft
- Eingeschränkte Einsichtsfähigkeit
- Keine Einwilligung in die Studienteilnahme

3.2.2 Ablauf der Studie

Von allen Teilnehmern wurden Alter, Geschlecht, Gewicht und Größe erfragt und die aktuelle Anamnese (inkl. Medikamentengebrauch) erhoben.

Im Rahmen der stationären Versorgung wurden die Konzentrationen von Magnesium, 25-OH-Vitamin D₃ (25OHD), Calcitriol, Parathormon (PTH), Albumin, Calcium, Cystatin C, Harnsäure, Phosphat und Kreatinin im Serum bestimmt. Weiterhin wurde die renale Ausscheidung von Magnesium, Calcium, Harnsäure, Phosphat, Kreatinin, Eiweiß und Glukose sowie Leukozytenzahl, pH-Wert und Dichte im 12-Stunden-Sammelurin erfasst. Im Forschungslabor der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock wurden die Konzentrationen von Fetuin-A und des C-terminalen Fragments von FGF-23 (cFGF-23) in Serum bzw. Plasma und die von Fetuin-A, Citrat und Oxalat im 12-Stunden-Sammelurin quantitativ bestimmt. Zusätzlich wurde Fetuin-A in Serum und Urin semiquantitativ mit Elektrophorese und Westernblot nachgewiesen.

Nieren- oder Harnleitersteine der Patienten wurden in der Praxis für Labormedizin von Herrn Dipl.-Chem. Dieter Wooßmann (Pasewalk) analysiert.

Fünf bis 20 Monate nach Steinabgang wurden Fetuin-A- und Citratkonzentration erneut im Spontanurin bestimmt.

3.3 Material

Das Blutentnahmesystem und die Monovetten stammten von der Firma Sarstedt AG & Co (Nümbrecht).

Zur Bestimmung der Konzentration von Fetuin-A im Serum bzw. Urin wurde der Human Fetuin-A ELISA Kit der Firma Epitope Diagnostics Inc. (San Diego, USA) verwendet. Für die Bestimmung von cFGF-23 im Plasma diente ein ELISA Kit der Firma Immutopics Inc. (San Clemente, USA). Die Citratkonzentration im Urin wurde mit einem Kit der Firma BioVision (Mountain View, USA) und die Konzentration von Oxalat mit einem Kit der Firma Libios (Bully, Frankreich) ermittelt.

Für die Datenspeicherung wurden Filemaker Version 7 (FileMaker Inc. Santa Clara, USA) und Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS Version 20.0 (SPSS Inc. Chicago, United States of America). Die graphischen Darstellungen wurden mit SigmaPlot Version 10.0 (Systat Software GmbH Erkrath, Deutschland) erstellt.

3.4 Methoden

3.4.1 Untersuchungsablauf

Eingeschlossen wurden Probanden, die während einer stationären Behandlung in der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Rostock über die Studie informiert wurden und sich zu freiwilligen Teilnahme entschließen konnten. Teilnahme eingeladen wurden. Bei Einverständnis wurden die Teilnehmer um eine Blutprobe und einen 12-Stunden-Sammelurin zum nächst möglichen Zeitpunkt gebeten. Zur Gewinnung von Serum und Plasma wurde das Blut mit 980g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgehoben, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Urin wurde ebenfalls aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Fehlende Informationen aus dem Anamnesegespräch wurden ggf. durch Angaben aus der Krankenakte ergänzt.

Patienten mit Nephro-/Urolithiasis wurden gebeten, nach Lithotrypsie ihren Urin zu filtrieren und abgegangene Steine bzw. Konkreme zur weiteren chemischen Analyse zu asservieren.

3.4.2 Steinanalyse

Alle Steine wurden zur Analyse an das Harnsteinanalysezentrum Pasewalk geschickt und als Kaliumbromid-Pressling im Infrarotspektrometer analysiert. Die Ergebnisse der Analyse wurden uns mitgeteilt und aus der Patientenakte entnommen.

3.4.3 Qualitativer Nachweis von Fetuin-A durch Elektrophorese und Western-Blot

Die elektrophoretische Trennung der Proteine in Urin und Serum erfolgte an einem 10%igen Polyacrylamidgel unter nichtreduzierenden Bedingungen.

Die Proteinkonzentration von Serum und Urinproben wurden auf 2mg/l eingestellt. Als Probenpuffer diente 1,5 mol/l TRIS-HCl, 0,2% SDS und Bromphenolblau, der Laufpuffer bestand aus 20mM TRIS, 200mM Glycin und 0,1% SDS. Dem Probepuffer wurde kurz vor Gebrauch Mercaptoethanol (1%) als Reduktionsmittel und Glycerol zur Erhöhung der Dichte zugesetzt. Die Proben wurden unmittelbar vor dem Einsatz in die Elektrophorese 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von max. 150V und wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront das untere Gelende erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel entnommen und die getrennten Proteine auf eine Polyvinyliden-Fluorid (PVDF) Membran überführt (Towbin et al. 1979). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 5% Magermilchpulver in 20mM TRIS, 0,3 M Natriumchlorid (pH 7,5) blockiert, bevor das Fetuin-A spezifische Ziegen-Anti-Fetuin-A-Antiserum zugesetzt und der Blot bei 4°C über Nacht damit inkubiert wurde.

Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt und gebundene Antikörper durch Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Esel-Anti-Ziegen-Antiserum und nachfolgender Chemilumineszenz sichtbar gemacht (Fischer et al 2011).

3.4.4 Berechnung abgeleiteter Parameter

a) Berechnung der eGFR [ml/min/1,73m²]

Zur Einschätzung der Nierenfunktion wurde die von der "Modification of diet in renal disease-Studiengruppe" ermittelte Formel (MDRD) für Europäer verwendet. In die Berechnung gehen die Konzentration von Kreatinin im Serum (S_{krea} ; [mg/dl]), das Alter [Jahre] sowie bei Frauen noch ein Korrekturfaktor ein (Levey et al. 1999,).

$$(1) \text{ eGFR}_{\text{Männer}} = 186 \times (S_{\text{Krea}})^{-1,154} \times (\text{Alter})^{-0,203}$$

$$(2) \text{ eGFR}_{\text{Frauen}} = 186 \times (S_{\text{Krea}})^{-1,154} \times (\text{Alter})^{-0,203} \times 0,742$$

b) Berechnung der maximalen tubulären Phosphatresorption (Phosphatschwelle) TmP/GFR [mmol/l]

In die Berechnung gehen die Phosphat- und Kreatinin-Konzentrationen in Serum (S_{Krea} , S_{P}) und in Urin (U_{Krea} , U_{P}) ein (Brodehl et al. 1982; Berndt et al. 1996).

$$(3) \frac{TmP}{GFR} = S_P - \frac{U_P \times S_{\text{Krea}}}{U_{\text{Krea}}}$$

3.4.5 Statistische Verfahren

Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollprobanden wurden bei normalverteilten Messwerten durch den t-Test und bei nicht normalverteilten Messwerten durch den Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Grundsätzlich wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Probanden

An der Studie nahmen 48 Patienten (34 männlich) und 39 Kontrollen (34 männlich) teil. Die anthropometrischen Daten der Studienteilnehmer und die Begleiterkrankungen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Charakteristika der Studienteilnehmer.

	Patienten (34M/14F)	Kontrollen (34M/5F)
Alter [Jahre]		
Männer	54,5 (24 - 84)	67,5 (38 - 82)*
Frauen	58,5 (38 - 78)	65 (49 - 74)*
Gewicht [kg]		
Männer	83,8 (67 - 139)	84 (65 - 120)
Frauen	74 (54 - 115)	65 (52 - 78)
Größe [m]		
Männer	1,78 (1,7 - 1,9)	1,78 (1,7 - 1,9)
Frauen	1,64 (1,5 - 1,8)	1,64 (1,6 - 1,7)
BMI [kg/m ²]		
Männer	26,7 (19,3 - 41,9)	26,7 (20,1 - 35,5)
Frauen	28,1 (20,1 - 41,5)	23,9 (18,2 - 31,2)
Erkrankungen		
Hypertonie	13	24
Adipositas	16	9
Diabetes mellitus Typ II	5	6
Harnwegsinfektion	3	3
Benigne Prostatahyperplasie	3	2
Hypothyreose	2	1
Prostatakarzinom	0	31*
Hyperlipoproteinämie	0	7*
Nierenzellkarzinom	0	5*
Medikamente		
Antihypertensiva	18	25
Statine	3	9
Antidiabetika	4	4

* p < 0,05

Die Patienten und Kontrollprobanden sind mit Blick auf Gewicht, Größe und BMI sehr gut vergleichbar, allerdings sind die Patienten deutlich jünger als die Probanden der Kontrollgruppe. Darüberhinaus sind in der Kontrollgruppe lediglich 5 Frauen eingeschlossen.

Zu den häufigen Erkrankungen der Studienteilnehmer zählen Hypertonie (n = 37), Adipositas (n = 25) und Diabetes mellitus Typ 2 (n = 11). Bei 8 Patienten lag keine dieser Erkrankungen vor, während bei 20 Patienten und 18 Kontrollprobanden mindestens eine und bei 6 Patienten und 11 Kontrollprobanden mehrere Erkrankungen gleichzeitig auftreten. Die Erkrankungen der Vergleichsgruppe, wie das Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom, Harnwegsinfektion und benigne Prostatahyperplasie, reflektieren die Rekrutierung von der Urologischen Station.

4.2 Ergebnisse der Steinalalyse

Leider konnten nur 25 Steine für die weitere Analyse aufgefangen werden. Es fanden sich 19 Whewellit-/Weddellitsteine (Calciumoxalatmonohydrat/Calciumoxalatdihydrat) und 4 Mischsteine, sowie je ein Harnsäure- und Carbonatapatitstein. Die Steinlokalisation, das therapeutische Verfahren und die Steinfreiheit sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tab. 3: Steinlokalisation, therapeutisches Verfahren u. Steinfreiheit. (Die Zeit zwischen Steinabgang und Nachuntersuchung wurde berechnet und für jede der Kategorien als Mittelwert (Ø) angegeben)

Steinlokalisation	ESWL	URS	PNL
Nephrolithiasis	31 Patienten (Ø 4 Monate steinfrei)	1 Patient (Ø 4 Monate steinfrei)	2 Patienten (Ø 6 Monate steinfrei)
Harnleiterstein	4 Patienten (Ø 6 Monate steinfrei)	8 Patienten (Ø 18 Monate steinfrei)	

4.3 Ergebnisse der Serumanalysen

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Laboruntersuchungen zusammengefasst. Bei den Studienteilnehmern sind die Befunde der Laboruntersuchungen im Normbereich. Lediglich die mittlere Konzentration von 25-OH-Vitamin D₃ ist deutlich erniedrigt (p < 0,05). Dennoch fällt auf, dass Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden einen höheren mittleren Calcium- und einen geringeren mittleren Phosphatspiegel (für beide Parameter p < 0,05) aufweisen. Die Magnesiumkonzentration ist in beiden Gruppen annähernd identisch.

Tab. 4: Biochemische Daten von Patienten und Kontrollen.

	Patienten	Kontrollen	p-Wert
Calcium [mmol/l] (2,20 - 2,55 mmol/l)	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	p < 0,05
Phosphat [mmol/l] (0,78 - 1,53 mmol/l)	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	p < 0,05
Magnesium [mmol/l] (0,74 - 1,03 mmol/l)	0,9 (0,7 - 0,9)	0,9 (0,0 - 1,0)	n.s.
Albumin [g/l] (35 - 48 g/l)	40,1 ± 3,6	39,7 ± 4,5	n.s.
Harnsäure [μmol/l] (286 - 518 μmol/l)	320 ± 67	340 ± 69	n.s.
Kreatinin [μmol/l] (57 - 113 μmol/l)	70,8 ± 14,9	82,7 ± 12,4	p < 0,001
eGFR [ml/min/1,73m ²] (> 60 ml/min/1,73m ²)	> 60	>60	n.s.
Cystatin C [mg/l] (0,58 - 1,02 mg/l)	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	n.s.
Parathormon [pg/ml] (15 - 65 pg/l)	49,2 (15 - 212)	40,4 (22,4 - 80,3)	n.s.
25OHD [nmol/l] (> 75 nmol/l)	56,8 ± 20,2	70,2 ± 24,8	p < 0,05
1,25DHCC [pg/ml] (43,2 – 148,8 pmol/l)	123,9 ± 67,6	101,4 ± 29,7	n.s.

Nach SDS-Page und Westernblot fanden sich im Serum und Urin die für Fetuin-A erwartete Banden bei knapp 50 kDa (Abb. 5).

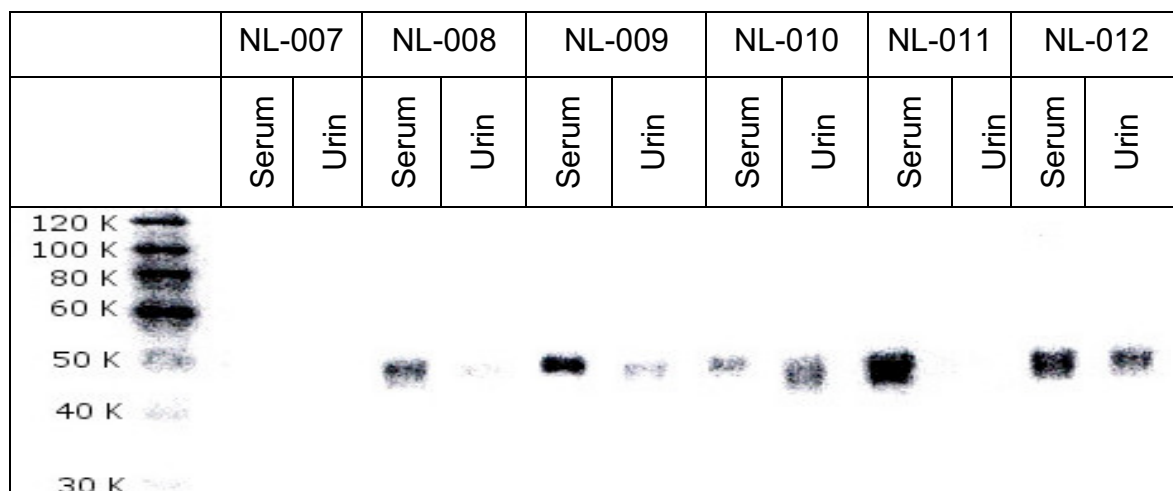


Abb 5: Qualitativer Nachweis von Fetuin-A in Serum und Urin. Die Proben von 6 zufällig gewählten Patienten zeigen die für Fetuin-A erwarteten Banden bei knapp 50 kDa.

Die Nierenfunktion der Studienteilnehmer ist nicht eingeschränkt und auch die zirkulierenden Konzentrationen von Fetuin-A und cFGF-23 unterscheiden sich nicht signifikant (Abb. 6).

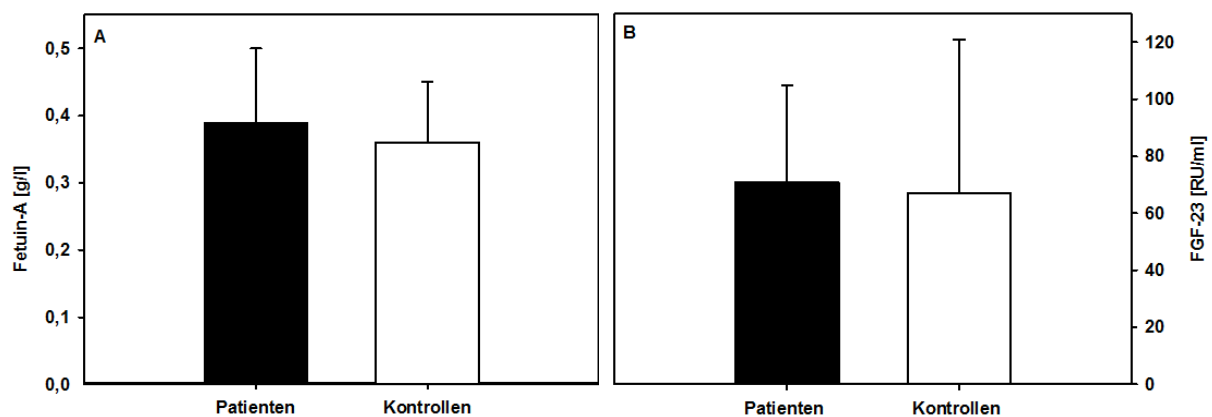


Abb.6: Fetuin-A (A) und FGF-23 im Serum von Patienten und Kontrollen.

4.4 Ergebnisse der Urinalysen

Die vor dem Steinabgang im 12-Stunden-Sammelurin bestimmten und auf Kreatinin normierten Konzentrationen von Calcium, Phosphat, Magnesium, Harnsäure, Oxalat, Citrat und Fetuin-A sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Die im 12-Stunden-Sammelurin bestimmten und auf Kreatinin normierten Konzentrationen.

	Patienten	Kontrollen	p-Wert
Kreatinin [mmol/l]	6,8 ± 4,6	7,3 ± 5,9	n.s.
Harnsäure/Kreatinin [mmol/l / mmol/l]	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,2	n.s.
Calcium/Kreatinin [mmol/l / mmol/l]	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2	p < 0,001
Magnesium/Kreatinin [mmol/l / mmol/l]	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	n.s.
Phosphat/Kreatinin [mmol/l / mmol/l]	2 ± 0,7	1,9 ± 0,9	n.s.
Phosphatschwelle [mmol/l]	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	n.s.
Oxalat/Kreatinin [mmol/l / mmol/l]	0,04 (0,01 - 0,2)	0,03 (0,01 - 0,2)	n.s.
Citrat/Kreatinin (1. Urin) [μmol/mmol]	93,7 (5,1 - 717,2)	146,61 (24,5 - 647,6)	n.s.
Fetuin-A/Kreatinin (1. Urin) [mg/mmol]	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,4	n.s.

Die Patienten weisen lediglich eine gegenüber den Kontrollen erhöhte Calciumausscheidung mit dem Urin auf (p < 0,001), während die Ausscheidung von Phosphat und Magnesium in beiden Gruppen vergleichbar ist. Die Konzentrationen von Oxalat und Citrat unterscheiden sich in beiden Gruppen nicht signifikant.

Trotz normaler Nierenfunktion fällt bei den Patienten gegenüber der Kontrollgruppe bei etwas höheren FGF-23 Serumkonzentrationen eine reduzierte Phosphatschwelle (Quotient aus max. tubulären Phosphatrückresorption und eGFR) auf (Abb. 7).

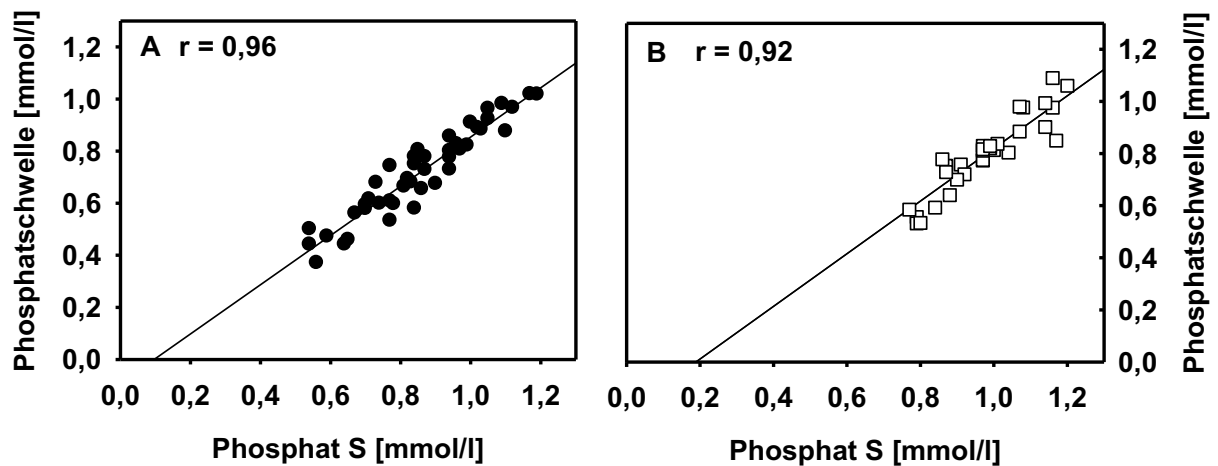


Abb. 7: Zusammenhang zwischen der Phosphatschwelle und Phosphatserumkonzentration bei Patienten (A) und Kontrollen (B).

Die Betrachtung der Fetuin-A Konzentration im Urin in Relation zur Zusammensetzung des Nierensteins ist in Abb. 8 dargestellt (n=25).

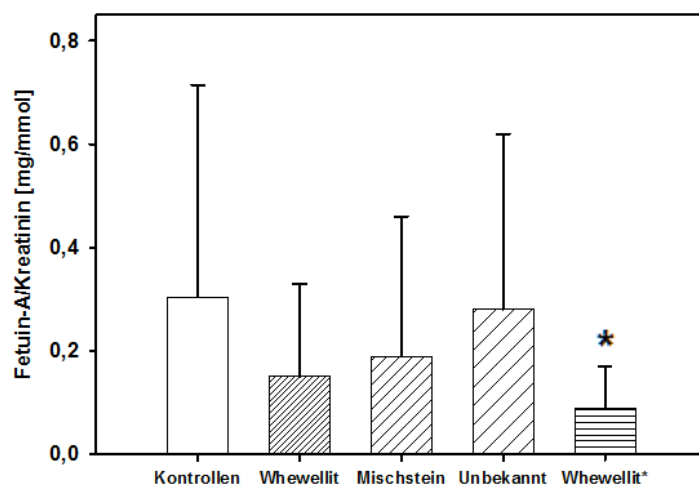


Abb. 8: Die auf Kreatinin normierten Konzentrationen von Fetuin-A bei Patienten und Kontrollen. Mit einem Whewellit-/Weddellitstein (n=19), einem Mischstein (n=4), einem unbekannten Stein (n=22) und einem Whewellitstein* ohne Vorliegen von wie in Tabelle 2 beschriebenen Erkrankungen (n=8) (* $p < 0,05$).

Es zeigt sich, dass für Patienten mit einem reinen Calciumoxalatmonohydratstein, einem Mischstein und einem unbekannten Stein keine Unterschiede der Fetuin-A Konzentration im Urin verglichen mit den Kontrollprobanden vorliegen. Allerdings konnte bei 8 Patienten mit einem reinen Calciumoxalatmonohydratstein ohne wie in Tabelle 2 beschriebenen Erkrankungen eine signifikant niedrigere Konzentration von Fetuin-A im Urin beobachtet werden ($p < 0,05$).

Auch fünf bis 20 Monate nach Steinabgang konnten in der untersuchten Population noch deutlich reduzierte auf die Kreatininausscheidung normierten Fetuin-A Konzentrationen und eine signifikante Erniedrigung der Citratkonzentrationen im Spontanurin beobachtet werden ($p < 0,05$) (Abb. 9).

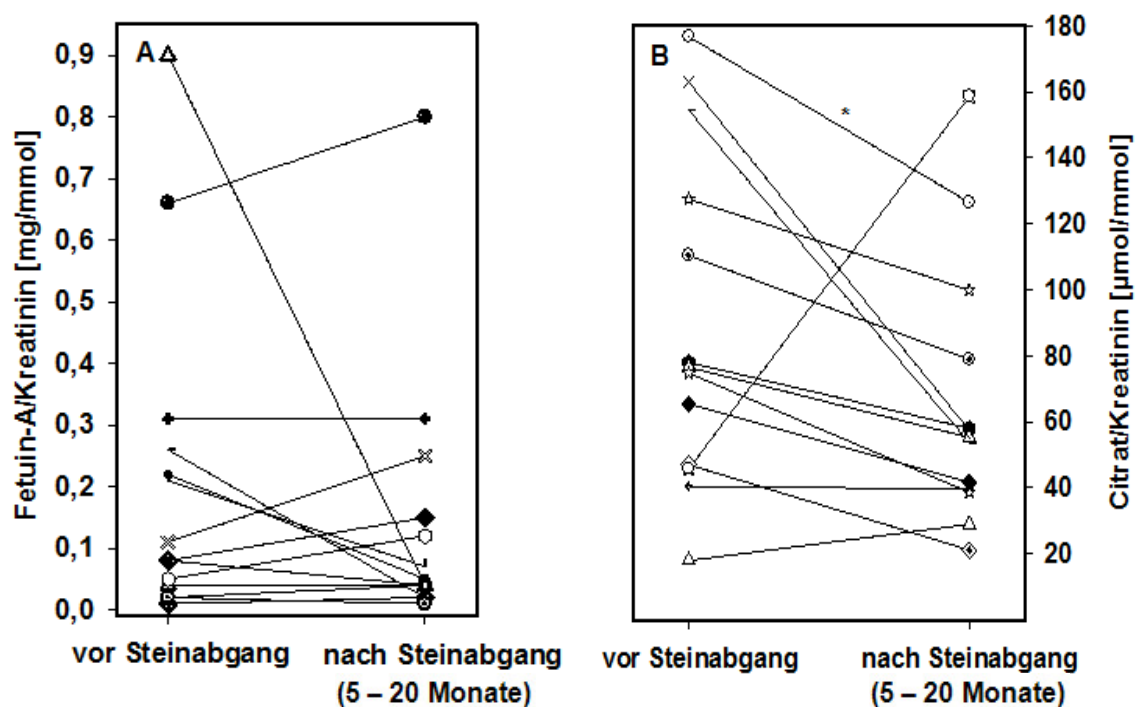


Abb. 9: Die Fetuin-A- (A) und Citratkonzentration (B) im Urin vor und nach Steinabgang mit $p < 0,05$ ($n=13$).

Zusammenfassend zeigte sich kein Unterschied der Serumkonzentrationen von cFGF-23 und Fetuin-A zwischen den Probandengruppen. Allerdings war die Konzentration von Fetuin-A im Urin der Patienten mit einem reinen Calciumoxalatmonohydratstein ohne Grunderkrankungen verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich niedriger ($p < 0,05$). Nach Steinabgang konnte eine reduzierte auf Kreatinin normierte Fetuin-A Konzentration und eine signifikante Erniedrigung der Citratkonzentration im Spontanurin beobachtet werden ($p < 0,05$).

5 Diskussion

Die Nephro-/Urolithiasis rückt zunehmend in den Mittelpunkt des medizinischen Interesse, und entwickelt sich in Deutschland mit einer aktuellen Prävalenz von rund 5% zu einer Volkskrankheit (Bauer-Delto 2011). Obwohl Ätiologie und Pathogenese auch bislang nur unvollständig aufgeklärt sind (Coe et al. 1992), gilt es als gesichert, dass die Modelle der homo- und heterogenen Nukleation nicht ausreichen, um die komplexen Vorgänge der Nierensteinentstehung zu erklären (Wendt-Nordahl et al. 2008). Betrachtet man Nierensteine als ein Beispiel für ektope Mineralisierung, rücken auch die für die orthotope Mineralisierung verantwortlichen Regelkreise und damit insbesondere FGF-23 und Fetuin-A in den Mittelpunkt des Interesse. FGF-23 reguliert im Zusammenspiel mit Parathormon und Calcitriol die Calcium- und Phosphathomöostase und die renale Phosphatausscheidung (Berndt und Kumar 2007). Das Glykoprotein Fetuin-A ist nicht nur ein Protein der akuten Phase, sondern auch einer der potentesten Verkalkungsinhibitoren (Jahnen-Dechent et al. 2008; Heiss et al. 2010; Pasch et al. 2012).

In dieser prospektiven Fall-Kontroll-Studie wurden die Konzentrationen von cFGF-23 und Fetuin-A bei Patienten mit Nephrolithiasis und einer Kontrollgruppe bestimmt. Außerdem wurde die maximale tubuläre Phosphatresorption (Phosphat-schwelle) bei Steinträgern und Kontrollprobanden ermittelt. Zusätzlich wurde geprüft, ob es nach Steinabgang zu einer Veränderung der Fetuin-A- und Citratkonzentration kam.

Die Serumkonzentrationen der untersuchten Parameter lagen bei allen Studienteilnehmern mit Ausnahme einer generell erniedrigten Vitamin D₃ Konzentration im Normbereich. Die Patienten zeigten, wie bereits auch in anderen Studien beschrieben, im Vergleich zu den Kontrollprobanden eine höhere Calciumkonzentration im Serum (Stejskal et al. 2008; Xu et al. 2010). Durch die erhöhte Calciumkonzentrationen im Serum kommt es zur erhöhten tubulären Calciumkonzentration, was die Plaqueentstehung begünstigt (Kuo et al. 2003). Interessanterweise waren die Phosphatkonzentration im Serum der Patienten deutlich niedriger als bei den Kontrollprobanden. In einer anderen Arbeit wurden eher erhöhte Phosphatkonzentrationen im Serum von Patienten mit Urolithiasis beschrieben (Xu et al. 2010). In dieser Studie lagen bei den Patienten erniedrigte Phosphatkonzentrationen im Serum bei gleichzeitiger Tendenz zu erhöhten cFGF-23 Konzentrationen vor. Eine andere Arbeit fand ebenfalls bei Patienten mit erhöhter Phosphatexkretion, Hypophosphatämie und einer reduzierten Phosphatschwelle eine signifikant erhöhte cFGF-23 Konzentration (Rendina et al. 2006). Die erhöhten tubulären Phosphatkonzentrationen scheinen interessanterweise keinen Einfluss auf

die Plaquebildung und somit auf die Nierensteinentstehung zu haben, daher ist der Einfluss der erniedrigten Phosphatschwelle auf die Nierensteinentstehung bisher schwer zu erklären und muss durch weitere Studien untersucht werden (Kuo et al. 2003). Es ist aber anzunehmen, dass die durch FGF-23 verursachten erhöhten Calcium- und Parathormonkonzentrationen ektope Mineralisierungsprozesse und somit auch die Nierensteinentstehung beeinflussen.

Die Fetuin-A Serumkonzentration der Patienten war gegenüber den Kontrollen ein wenig höher, unterschied sich aber nicht signifikant. Dieser Befund wird von mehreren kürzlich durchgeführten Studien (Stejskal et al. 2008, Prezioso et al. 2013) gestützt. Es kann vermutet werden, dass es durch die erhöhte Calciumkonzentration im Serum der Patienten zu einer solchen Erhöhung der Fetuin-A Konzentration kommt. Diese ist für eine wirkungsvolle Inhibition der Mineralisierungsprozesse verantwortlich.

Die Patienten hatten im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant höhere Calciumkonzentration im Urin. Die Konzentrationen von Phosphat und Magnesium unterschied sich zwischen Patienten und Kontrollen nicht signifikant.

Die Konzentration von Oxalat war im Urin der Patienten höher und die von Citrat im Vergleich zur Kontrollgruppe minimal niedriger. Diese Tendenz bestätigt die Studienlage, denn erhöhte Konzentrationen von Oxalat begünstigen durch die Anlagerung an Calcium zu Calciumoxalat die Nierensteinentstehung. Die Citronensäure hingegen bildet einen Komplex mit Calciumionen, sodass diese weniger zur Calciumoxalatbildung zur Verfügung stehen und somit protektiv wirkt. Die auf Kreatininausscheidung normierte Fetuin-A Konzentration im Urin war bei Patienten mit einem reinen Calciumoxalatmonohydratstein ohne Grunderkrankungen verglichen mit den Kontrollprobanden deutlich niedriger ($< 0,05$). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von anderen kürzlich durchgeführten Studie (Stejskal 2008, Wu et al. 2014) überein. In den genannten Studien wurde jedoch keine differenzierte Betrachtung der unterschiedlichen Steinarten vorgenommen. Die Population dieser Arbeit zeigte für Patienten mit Mischsteinen oder unbekannten Steinarten kein Unterschied der Fetuin-A Konzentration im Urin verglichen mit den Kontrollprobanden

Bisher gab es noch keine Erkenntnisse darüber, wie sich Fetuin-A- und Citratkonzentration vor und nach Steinabgang verhalten. Wir fanden fünf bis 20 Monate nach Steinabgang deutlich reduzierte auf die Kreatininausscheidung bezogene Fetuin-A Konzentration und eine signifikante Erniedrigung der Citratkonzentration im Spontanurin ($p < 0,01$). Die Fetuin-A- und Citraterniedrigung nach Steinabgang könnte durch deren Verbrauch in den Nierensteinen erklärt

werden. Die erniedrigte Konzentration dieser Inhibitoren kann der Ausgangspunkt für die erneute Entstehung eines Nierensteins und somit einer Rezidiventwicklung sein. Das könnte die hohe Rezidirate von 60% erklären (Bauer-Delto 2011).

Nach der Literaturlage ist dies die erste Untersuchung, die Konzentrationen von FGF-23 und Fetuin-A vor und nach abgeschlossener Steintherapie analysierte. Die Ergebnisse legen nahe, dass FGF-23 und Fetuin-A auf die Steinentstehung Einfluss nehmen. Zwar fand sich kein Unterschied der Serumkonzentrationen von cFGF-23 und Fetuin-A zwischen den Probandengruppen. Allerdings war die Konzentration von Fetuin-A im Urin der Patienten mit einem reinen Calciumoxalatmonohydratstein ohne Grunderkrankungen verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich niedriger ($p < 0,05$) bei gleichzeitig reduzierter Phosphatschwelle. Auch zeigte sich nach Steinabgang eine reduzierte auf Kreatinin normierte Fetuin-A Konzentration und eine signifikante Erniedrigung der Citratkonzentration im Spontanurin ($p < 0,05$).

Kritisch anzumerken ist, dass unsere Untersuchung erhebliche Limitationen aufweist. Dazu gehören die geringe Fallzahl und das inhomogene Geschlechterverhältnis. In der Kontrollgruppe gibt es deutlich weniger Frauen als Männer, was das Patientengut einer urologischen Station reflektiert aber die Ergebnisse hinsichtlich des Knochenstoffwechsels deutlich verzerren. Hier wäre bei neueren Untersuchungen sicherlich eine Matching der Patienten und Probanden zu empfehlen. Auch wurde im Studiendesign leider nicht berücksichtigt die 12-Stunden-Sammelurinphasen zum gleichen Zeitpunkt durchzuführen. Somit sind die bestimmten Metaboliten ungenau, da diese tageszeitlichen Schwankungen unterliegen und von der Nahrungsaufnahme versus Nüchternphase abhängig sind. Allerdings haben wir durch die auf Kreatin normierten Konzentrationen versucht diese Ungenauigkeit zu minimieren. Weiterhin wurden die Ergebnisse der Metaboliten des Knochenstoffwechsels erheblich beeinflusst, weil die Ausschlusskriterien der Patientenauswahl keine Probanden mit Knochenmetastasen ausgeschlossen haben. Die unvollständige Zahl an vorliegenden Steinanalysen und die völlig heterogene zeitliche Aufteilung der Untersuchung vor/nach Steintherapie beeinflussen die Aussagekraft dieser Studie erheblich. Denn durch therapiebedingte passagere Nierenfunktionsstörungen v. a. tubulärer Art kann die Urinzusammensetzung deutlich verändert sein, ferner auch durch Steinreste, die zum Sammelzeitpunkt im Patienten sind (Laube et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung können daher nur als Anhaltspunkt für die Formulierung von Hypothesen und die Konzeption weiterer Studien dienen.

6 Zusammenfassung

Obwohl 80% der Calciumoxalatsteine idiopathisch entstehen, ist das Wissen über die Ätiologie und Pathogenese der Urolithiasis unvollständig. Die verschiedenen Modelle der homo- und heterogenen Nukleation reichen nicht aus, um die Pathogenese der Nierensteine vollständig zu erklären und die für die Mineralisierung relevanten Regelkreise wurden im Hinblick auf die Entstehung von Nierensteinen bisher nur teilweise untersucht. Unter den für die orthotope und ektope Mineralisierung relevanten Faktoren sollten FGF-23 als Regulator der Calcium- und Phosphathomöostase und Fetuin-A als Verkalkungsinhibitor im Hinblick auf die Entstehung von Nierensteinen untersucht werden.

An der Fall-Kontroll-Studie nahmen 48 Patienten und 39 Kontrollen teil. Alle Probanden wurden stationär in der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Rostock behandelt.

Die Serumkonzentrationen von cFGF-23 und Fetuin-A unterschieden sich zwischen den Probandengruppen nicht. Allerdings war die Konzentration von Fetuin-A im Urin der Patienten mit einem reinen Calciumoxalatmonohydratstein ohne Grunderkrankungen verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich niedriger ($p < 0,05$). Für Patienten mit Mischsteinen oder unbekannten Steinarten konnte kein Unterschied der Fetuin-A Konzentration im Urin verglichen mit den Kontrollprobanden beobachtet werden. Nach Steinabgang konnte eine reduzierte auf Kreatinin normierte Fetuin-A Konzentration und eine signifikante Erniedrigung der Citratkonzentration im Spontanurin beobachtet werden. Die reduzierte Konzentration des Verkalkungsinhibitors Fetuin-A und des Komplexbildners Citrat nach Steinabgang könnte durch deren Verbrauch in den Nierensteinen erklärt werden. Die erniedrigte Konzentration dieser Inhibitoren könnte der erneute Ausgangspunkt für die Entstehung eines Nierensteins und somit ein Rezidiv sein.

7 Thesen

In den bislang vorliegenden Studien wurden die für die orthotope und ektope Mineralisierung relevanten Regelkreise in Hinblick auf die Entstehung von Nierensteinen nur teilweise untersucht. Wir postulieren, dass die Entstehung von Nierensteinen als ektope Mineralisierung aufgefasst werden kann und dass hier FGF-23 und Fetuin-A beteiligt sind. Mit dieser prospektiven Fall-Kontroll-Studie konnten wir diesbezüglich folgende Aussagen treffen:

1. Die Serumkonzentrationen von cFGF-23 und Fetuin-A unterscheiden sich zwischen den Steinbildnern und Kontrollprobanden nicht.
2. Trotz normaler Nierenfunktion fällt bei den Steinpatienten gegenüber der Kontrollgruppe eine reduzierte Phosphatschwelle auf.
3. Die Konzentration von Fetuin-A ist im Urin der Patienten mit einem reinen Calciumoxalatmonohydratstein ohne Grunderkrankungen verglichen mit Kontrollprobanden deutlich niedriger ($p < 0,05$).
4. Für Patienten mit Mischsteinen oder unbekannten Steinarten konnte kein Unterschied der Fetuin-A Konzentration im Urin verglichen mit den Kontrollprobanden beobachtet werden.
5. Nach Steinabgang kann eine reduzierte auf die Kreatininausscheidung bezogene Fetuin-A Konzentration und eine signifikante Erniedrigung der Citratkonzentration im Spontanurin beobachtet werden ($p < 0,05$).

8 Literaturverzeichnis

- Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben B (2012). FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2–SGK1 signaling pathway. *Bone*, 51(3), 621–628.
- Bauer-Delto A (2011). Harnsteine. Wege zu dauerhafter Steinfreiheit. Pädiatrix, Das Magazin für Kinderheilkunde.
- Berndt M; Ehrich JH; Lazovic D; Zimmermann J; Hillmann G, Kayser C (1996). Clinical course of hypophosphatemic rickets in 23 adults. *Clin Nephrol* 45 (1), 3–41.
- Berndt T, Kumar R (2007). Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol* 69, 341–359.
- Brodehl J, Gellissen K, Weber HP (1982). Postnatal development of tubular phosphate reabsorption. *Clin Nephrol* 17 (4), 163–171.
- Brown WM, Dziegielewska KM (1997). Friends and relations of the cystatin superfamily new members and their evolution. *Protein Sci* 6 (1), 5–12.
- Brylka L, Büscher A, Dietzel E, Floehr J, Herrmann M, Kinkeldey A, Wessling J: Fetuin Protein. <http://www.biointerface.rwth-aachen.de>
- Cao Y, Sagi S, Hacker A, Steidler A, Alken P, Knoll T (2006). Impact of hypoxia and hypercapnia on calcium oxalate toxicity in renal epithelial and interstitial cells. *Urol Res* 34 (4), 271–276.
- Coe FL, Parks JH, Asplin JR (1992). The pathogenesis and treatment of kidney stones. *N Engl J Med* 327 (16), 1141–1152.
- Coe FL, Evan A, Worcester E (2005). Kidney stone disease. *J Clin Invest* 115 (10), 2598–2608.
- Dickson IR, Bagga M, Paterson CR (1983). Variations in the serum concentration and urine excretion of alpha 2HS-glycoprotein, a bone-related protein, in normal individuals and in patients with osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Int* 35 (1), 16–20.
- Emmett M (2008). What does serum fibroblast growth factor 23 do in hemodialysis Patients?. *Kidney* (2008) 73, 3 – 5.
- Evan AP, Coe FL, Lingeman JE, Shao Y, Sommer AJ, Bledsoe SB (2007). Mechanism of formation of human calcium oxalate renal stones on Randall's plaque. *Anat Rec (Hoboken)* 290 (10), 1315–1323.
- Evan AP, Coe FL, Rittling SR, Bledsoe SM, Shao Y, Lingeman JE, Worcester EM (2005). Apatite plaque particles in inner medulla of kidneys of calcium oxalate stone formers: osteopontin localization. *Kidney Int* 68 (1), 145–154.

- Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Parks JH, Bledsoe SB, Shao Y (2003). Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest* 111 (5), 607–616.
- Fischer DC, Schaible J, Wigger M, Staude H, Drueckler E, Kundt G, Haffner D (2011). Reduced serum fetuin-A in nephrotic children: a consequence of proteinuria? *Am J Nephrol* 34(4): 373-80.
- Gnanandaraja JS, Abrahante JE, Lulich JP, Murtaugh MP (2012). Presence of *Oxalobacter formigenes* in the intestinal tract is associated with the absence of calcium oxalate urolith formation in dogs. *Urol Res* 40 (5), 467–473.
- Hautmann R, Huland H (2006). *Urologie*. 3. überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richtering W, van Dorp W, Schafer C, Jahnen-Dechent W (2008). Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem* 283 (21), 14815–14825.
- Heiss A, Pipich V, Jahnen-Dechent W, Schwahn D (2010). Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J* 99 (12), 3986–3995.
- Hesse A. (2002). Urinary calculi. 1: Epidemiology, laboratory diagnosis, genetics and infections. *Urologe A* 41 (5), 496-506.
- Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A, Muller-Esterl W, Sablitzky F, Kaiser S, Blessing M (1997). Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem* 272 (50), 31496–31503.
- Jahnen-Dechent W. Reprints from Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine, 5 Vol. Set, ISBN 0-471-37494-6
- Jahnen-Dechent W, Schafer C, Ketteler M, McKee MD (2008). Internal chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med (Berl)* 86 (4), 379–389.
- Kim SC, Coe FL, Tinmouth WW, Kuo RL, Paterson RF, Parks JH (2005). Stone formation is proportional to papillary surface coverage by Randall's plaque. *J Urol* 173 (1), 117-9.
- Kuo RL, Lingeman JE, Evan AP, Paterson RF, Parks JH, Bledsoe SB (2003). Urine calcium and volume predict coverage of renal papilla by Randall's plaque. *Kidney Int* 64 (6), 2150–2154.
- Kuro-O M (2012). *Endocrine FGFs and Klothos*. New York, NY: Springer US, 2012. 1 online resource. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 728). ISBN: 1461408873.

- Laube N, Berg W (2014). Carefully conducted preanalytic and postanalytic procedures for urine samples. Often neglected in urolithiasis treatment. *Urologe A* 53 (1), 48-54
- Lee C, Bongcam-Rudloff E, Sollner C, Jahnen-Dechent W, Claesson-Welsh L (2009). Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Front Biosci* 14, 2911–2922.
- Lee M, Partridge NC (2009). Parathyroid hormone signaling in bone and kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18 (4), 298–302.
- Levey AS, Greene T, Beck GJ, Caggiula AW, Kusek JW, Hunsicker LG, Klahr S (1999). Dietary protein restriction and the progression of chronic renal disease: what have all of the results of the MDRD study shown? *J Am Soc Nephrol* 10 (11), 2426–2439.
- Lohninger H. (2013). Tabelle von Löslichkeitsprodukten. <http://www.anorganik.chemie.vias.org>.
- Matlaga BR, Coe FL, Evan AP, Lingeman JE (2007). The role of Randall's plaques in the pathogenesis of calcium stones. *J Urol.* 177 (1), 31–38.
- Osawa M, Umetsu K, Sato M, Ohki T, Yukawa N, Suzuki T, Takeichi S (1997). Structure of the gene encoding human alpha 2-HS glycoprotein (AHSG). *Gene* 196 (1-2), 121–125.
- Pasch A, Farese S, Graber S, Wald J, Richtering W, Floege J, Jahnen-Dechent W (2012). Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum. *J Am Soc Nephrol* 23 (10), 1744–1752.
- Prezioso D, Saita A, Motta M, Porena M, Micheli C, Iliano E (2013). Serum fetuin-A and recurrent urolithiasis in young adults. In: *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Società italiana di ecografia urologica e nefrologica / Associazione ricerche in urologia* 85 (4), 180–183.
- Randall A (1937). The origin and growth of renal calculi. *Ann Surg* 105 (6), 1009–1027.
- Rendina D, Mossetti G, Filippo G, Cioffi M, Strazzullo P (2006). Fibroblast growth factor 23 is increased in calcium nephrolithiasis with hypophosphatemia renal phosphate leak. *J Clin Endocrinol Metab* 91 (3), 959–963.
- Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J (2003). The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 112 (3), 357–366.
- Schlieper G, Westenfeld R, Brandenburg V, Ketteler M (2007). Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial* 20 (2), 113–121.

- Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Yasuhiro (2004). FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19 (3), 429–435.
- Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya Takashi (2004). FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun* 314 (2), 409–414.
- Siener R, Glatz S, Nicolay C, Hesse A (2004). The role of overweight and obesity in calcium oxalate stone formation. *Obes Res* 12 (1), 106–113.
- Shroff RC, Shah V, Hiorns MP, Schoppet M, Hofbauer LC, Hawa G (2008). The circulating calcification inhibitors, fetuin-A and osteoprotegerin, but not matrix Gla protein, are associated with vascular stiffness and calcification in children on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 23 (10), 3263–3271.
- Stade H, Jeske S, Schmitz K, Warncke G, Fischer DC (2013). Cardiovascular risk and mineral bone disorder in patients with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2013;37(1):68-83.
- Strohmaier WL, Hörmann M, Schubert G (2013). Papillary calcifications: a new prognostic factor in idiopathic calcium oxalate urolithiasis. *Urolithiasis.* 2013 Nov; 41 (6): 475-9.
- Stejskal D, Karpisek M, Vrtal R, Student V, Solichova P, Fiala R, Stejskal P (2008). Urine fetuin-A values in relation to the presence of urolithiasis. *BJU Int* 101 (9), 1151–1154.
- Stoller ML, Meng MV, Abrahams HM, Kane JP (2004). The primary stone event: a new hypothesis involving a vascular etiology. *J Urol* 171 (5), 1920–1924.
- Szweras M, Liu D, Partridge EA, Pawling J, Sukhu B, Clokie Cameron (2002). Alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling. *J Biol Chem* 277 (22), 19991–19997
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(9): 4350-4.
- van Husen M, Fischer A, Lehnhardt A, Klaassen I, Moller K, Muller-Wiefel D, Kemper MJ (2010). Fibroblast growth factor 23 and bone metabolism in children with chronic kidney disease. *Kidney Int* 78 (2), 200–206.
- Verkoelen CF (2006). Crystal retention in renal stone disease: a crucial role for the glycosaminoglycan hyaluronan? *J Am Soc Nephrol* 17 (6), 1673–1687.

- Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C (2010). Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int* 78 (2), 140–145.
- Vervaet BA, Verhulst A, Dauwe SE, Broe ME, D'Haese PC (2009). An active renal crystal clearance mechanism in rat and man. *Kidney Int* 75 (1), 41–51.
- Vervaet BA, Verhulst A, D'Haese PC, Broe ME (2009). Nephrocalcinosis: new insights into mechanisms and consequences. *Nephrol Dial Transplant* 24 (7), 2030–2035.
- Voigt M, Fischer DC, Rimpau M, Schareck W, Haffner D (2010). Fibroblast growth factor (FGF)-23 and fetuin-A in calcified carotid atheroma. *Histopathology* 56 (6), 775–788.
- Weikert C, Stefan N, Schulze MB, Pischon T, Berger K, Joost (2008). Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Circulation* 118 (24), 2555–2562.
- Wendt-Nordahl G, Evan AP, Spahn M, Knoll T (2008). Kalziumoxalatsteinbildung. Neue pathogenetische Aspekte einer alten Erkrankung. *Urologe* 2008. 47: 538 - 544
- Williams JC, Matlaga JR, Brian R, Kim SC, Jackson ME, Sommer AJ, McAteer, James A. et al. (2006). Calcium oxalate calculi found attached to the renal papilla: Preliminary evidence for early mechanisms in stone formation. *J Endourol* 20 (11), 885–890.
- Wolf M (2012). Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int* 82 (7), 737–747.
- Wu YX, Li Cheng Y, Deng YL (2014). Patients with had lower fetuin-Aprotein level in urine and renal tissue. In: *Urolithiasis* 42 (1), 29–37
- Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, Ijuin C, Yamamoto R, Suemune S (2007). Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23. *Bone* 40 (6), 1565–1573.
- Zhang W, Edwards A (2002). Oxygen transport across vasa recta in the renal medulla. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (3), 1042-55.
- Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PS, Hoffert JD, Yasuda H (2006): Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* 70 (10), 1847–1857.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe, nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und weder diese noch eine andere Arbeit zuvor an einer Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Rostock, den 22.03.2016

Fabian Ludwig